

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Veronika Klimková

Molekulární podstata penetrace spermií a jejich membránové fúze s oocytem
v rámci oplození u savců
Sperm cell penetration and membrane fusion with oocyte during fertilization in
mammals

Bakalářská práce

Vedoucí práce/Školitel: doc. RNDr. Ing. Vladimír Krylov, Ph. D.

Praha 2019

Poděkování

Velice ráda bych poděkovala svému školiteli docentovi Vladimíru Krylovovi za vedení mé práce, umožnění se věnovat danému tématu a za cenné rady po celou dobu spolupráce. Dále mé poděkování patří celé rodině za podporu během studia.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně s požitím literatury, která je řádně uvedena v seznamu použité literatury a na základě konzultací se svým školitelem.

V Praze, 05.05.2019

Veronika Klimková

Abstrakt

Oplození je proces skládající se z mnoha kroků, které na sebe musejí navazovat a doplňovat se. Spermie jsou schopny oplození až po kapacitaci, hyperaktivaci a po spuštění akrozomální reakce. Vajíčka obklopená kumulárními buňkami naopak vysílají signály k aktivaci a orientaci spermií. Tato práce je zaměřena na nejnovější poznatky rolí kumulárních buněk, tedy tvorbu chemoatraktivních látek a zdali kumulární buňky spouštějí akrozomální reakci po navázání nově objeveného proteinu NYD-SP8. Zdá se, že progesteron indukuje akrozomální reakci a že je nejlepším chemoatraktantem vylučovaným kumulárními buňkami. Dále se zde zabýváme fúzí cytoplazmatických membrán spermií a vajíčka, kde jsou potřebné povrchové proteiny jako je Juno a IZUMO1.

Klíčová slova: fúze membrán, kumulární buňky, akrozomální reakce, chemotaxe, spermie, vajíčko, oplození

Abstract

Fertilization is a process involving multiple steps, which are in continuity and complement each other. Spermatozoa become competent to fertilize after capacitation, hyperactivation and acrosome reaction. Oocytes are surrounded by a layer of cumulus cells and give a signals for spermatozoa to activation and orientation. This study focuses on the latest knowledges about a roles of cumulus cells, production of chemoattractants and the possibility that cumulus cells induce the acrosome reaction after binding a novel sperm protein NYD-SP8 to the cumulus. It seems that progesterone induce the acrosome reaction and also is the best chemoattractant secreted by cumulus cells. Next I am focus on gamete fusion including the role of surface proteins such as Juno and IZUMO1.

Key words: membrane fusion, cumulus cells, acrosome reaction, chemotaxis sperm, oocyte, fertilization

Obsah

Úvod	1
Oplození	3
Komunikace spermií s kumulárními buňkami a akrozomální reakce	4
Membránový protein NYD-SP8.....	4
Vliv NYD-SP8 na oplození oocyty	5
Zahájení akrozomální reakce – zona pellucida nebo kumulární buňky?	5
Akrozin.....	6
Signalizace spermií a kumulárních buněk.....	7
Průběh akrozomální reakce v samičím reprodukčním traktu <i>in vivo</i>	7
Kumulární buňky a chemotaxe.....	9
Proteiny nezbytné pro fúzi spermií a oocyty	12
CD9	12
Juno	13
IZUMO1	14
Interakce IZUMO1 s proteinem Juno.....	16
Fertilin	17
Závěr.....	19
Seznam použité literatury	20

Úvod

Rozmnožování je nejdůležitějším krokem od vzniku života, vede k vývoji a udržování všech druhů na Zemi. Zásadní je jak u prokaryot tak pro mnohobuněčné velké savce. Napříč druhů existuje mnoho odlišností, variant a molekulárních postupů při vzniku nového jedince. V této práci se zaměřuji na savčí druhy, s cílem porovnání a pochopení mechanismů především u lidí.

Aby mohlo dojít k vývoji nového jedince, je zapotřebí vzniku zygoty, splynutím spermie a vajíčka, Bakalářská práce je zaměřena na komunikaci a interakci mezi gametami. Jsou zde uvedeny nejnovější poznatky a objevy, které v poslední době vyvracejí původní myšlenky. Experimenty jsou nejčastěji prováděny in vitro, nicméně pro výzkum oplození jsou potřebné komplexní faktory, a proto jsem se také zaměřila na experimenty in vivo, kterých začíná přibývat.

Popsáním procesu chemotaxe, která orientuje spermie ke kumulárním buňkám, se dostaneme až k samotnému vajíčku. Hrají zde roli chemoatraktivní látky vylučované samičím reprodukčním traktem a receptory zachytávající tyto signály na spermiích. V práci jsou uvedeny nejsilnější chemoatraktivní látky a jejich vliv na spermie. Úspěšné spermie se dostávají ke kumulárním buňkám, které tvoří první obalovou vrstvu vajíčka. Zde se dostává do konfliktu původní model, který říká, že akrozomální reakce je spuštěna až za touto vrstvou, tedy po navázání spermie na zonu pellucidu a nový model, který se zaměřuje detailněji na signalizaci mezi kumulárními buňkami a spermií. Dříve na tyto buňky nebyl kladen příliš velký důraz, a proto se až nyní dostávají do popředí. Je to silná vrstva buněk, daleko kompaktnější a složitější pro průnik spermií, než bylo myšleno. Proto je potřebné vylítní obsahu akrozomálního váčku již na kumulární buňky.

Poté, co spermie projdou skrz kumulární buňky a zonu pellucidu, nastává poslední krok před splynutím gamet a tím je fúze membrán. Na povrchu spermie i vajíčka je plno proteinů, které slouží k vzájemné interakci, buněčné adhezi a samotné fúzi. Jsou zde popsány čtyři hlavní proteiny zprostředkovávající fúzi membrán, jejich struktury a interakce.

Deficit uvedených proteinů může vést až ke sterilitě, a proto je pochopení fungování těchto postupů důležité. Věřím, že výzkum molekulárních mechanismů mezi

gametami má dalekou budoucnost a přispěje v metodě IVF (in vitro fertilizaci) či k léčbě neplodnosti, jejichž příčin je velké množství.

Oplození

Oplození oocyty se skládá z mnoha kontrolovaně řízených postupů, probíhá komplexní proces, který vede k fúzi genetického materiálu spermie a oocyty. Během procesu dochází k morfologickým změnám a k fyziologickým či biochemickým interakcím mezi gametami (Rowe, 2015; cit. dle Southern a kol., 2018). U spermií dochází ke kapacitaci ve vejcovodu, dále musí dojít k akrozomální reakci (Okabe, 2013), penetraci kumulárními buňkami, k vazbě a průchodu přes zonu pellucidu (ZP) a až poté k fúzi plazmatických membrán (Yanagimachi, 1994; cit. dle Sun a kol., 2011).

Samčí i samičí pohlavní buňky mají vlastní cytoplazmatickou membránu, mezi kterými dochází k fúzi (Theodore, 2018). Mechanismus této fúze není zcela objevený a je zatím známo jen pár molekul, které se klíčového procesu účastní. Mezi ně patří IZUMO1, CD9 a nově objevený protein Juno (Klinovska a kol., 2014). Tyto proteiny mezi sebou spolupracují, interagují a umožňují těsné přiblížení plazmatických membrán, které je nutné pro následující fúzi. Můžeme je nazývat adhezivními proteiny, fúzními proteiny, nebo proteiny zprostředkovávající kontaktní oblast. Stejně tak i jejich interakční partneři nejsou kompletně popsáni (Chalbi a kol., 2014). K analýze těchto molekul se využívají enzymatické inhibitory a protilátky v *in vitro* podmínkách. (Okabe, 2013).

Komunikace spermií s kumulárními buňkami a akrozomální reakce

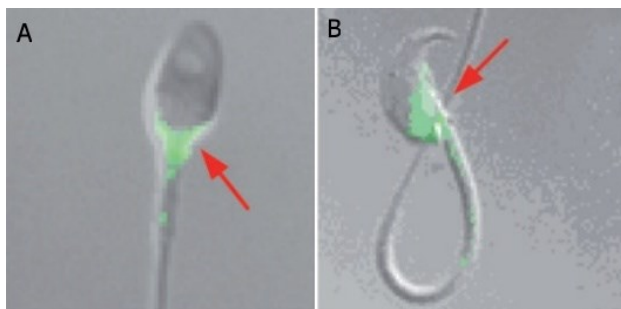
Morfologie spermií se liší téměř u každého druhu, ale u většiny se v oblasti hlavičky nachází organela zvaná akrozom, který je odvozený od Golgiho aparátu (Yanagimachi, 1994; cit. dle Sun a kol., 2011). Akrozomální reakce musí proběhnout u všech savců během oplození. Dochází k exocytóze, tedy uvolnění celého obsahu akrozomu, který naruší obalové vrstvy oocyty. Jde o fúzi vnější membrány akrozomálního váčku s plazmatickou membránou spermie (Hirohashi, 2016).

Kumulární buňky uvolňují progesteron, který má vliv na akrozomální reakci (Roldan a kol., 1994). Tyto buňky obklopují oocyt a tvoří jeho první obalovou vrstvu. Následuje vnitřní tenčí glykoproteinový obal zona pellucida (Yanagimachi, 1994; cit. dle Sun a kol., 2011). Progesteron vylučovaný kumulárními buňkami také slouží jako hlavní chemoatraktant pro spermie v samičím reprodukčním systému (Oren-Benaroya a kol., 2008). Po nedávno objeveném proteinu na povrchu spermie by mohla být přisouzena nová funkce vrstvě kumulárních buněk, tedy iniciace akrozomální reakce. Experimenty byly prováděny nejčastěji *in vitro* s oocyty očištěnými od kumulárních buněk, a proto jejich funkce byla doposud přehlížena (Sun a kol., 2011).

Membránový protein NYD-SP8

Protein NYD-SP8 je vázán pomocí GPI kotvy v membráně (Yin a kol., 2008). Je lokalizován na zadní části hlavičky spermie. Nachází se u celé řady druhů savců (Meyers a kol., 1999). Pomocí protilátky byl u myši objeven protein TES101, který má stejnou funkci jako lidský NYD-SP8. Je exprimován na pohlavních buňkách

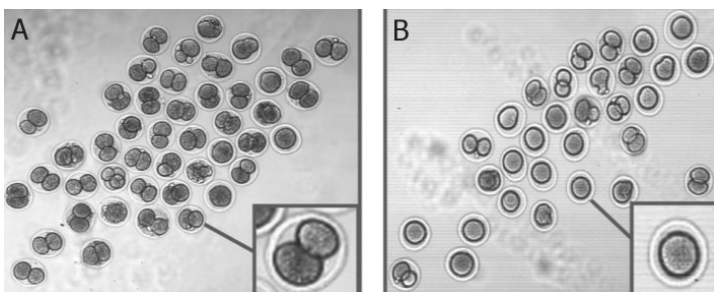
během jejich vývoje ve varlatech, v jiných tkáních se nenachází (Kurita a kol., 2000). Je to povrchový protein na spermiích o 1123 nukleotidech (Yin a kol., 2008).



Obrázek 1 Lokalizace NYD-SP8 A) na lidské spermii B) na myší spermii, červené šipky značí posteriorní část s proteinem (Yin a kol., 2008)

Vliv NYD-SP8 na oplození oocyty

Ukazuje se, že uvolnění NYD-SP8 a průběh akrozomální reakce již na kumulárních buňkách je významný pro oplození oocyty. Během inkubace spermií s komplexem kumulárních buněk a oocytů (COC komplex) se počet vzniklých dvoubuněčných embryí odvíjí dle množství koncentrace protilátek proti NYD-SP8. Čím větší byla koncentrace protilátek, tím došlo k menšímu množství oplození (Yin a kol., 2008).



Obrázek 2 Vliv NYD-SP8 na oplození oocytů: A) kontrolní sérum bez protilátek B) redukováný počet dvoubuněčných embryí s protilátkami proti NYD-SP8 (Yin a kol., 2008)

Zahájení akrozomální reakce – zona pellucida nebo kumulární buňky?

K vyvolání akrozomální reakce nedochází výhradně na zoně pellucidě (ZP), po navázání spermií. U většiny spermií dochází k akrozomální reakci již mezi kumulárními buňkami, které tvoří buněčnou masu kolem oocyty. Pomocí fluorescenčního mikroskopu u označených spermií (akrozom – green fluorescent protein, GFP, středová část s mitochondriemi – red fluorescent protein, Ds-Red2) bylo zjištěno, že spermie, které prodělají akrozomální reakci před objevením ZP, mohou projít přes ZP a dosáhnout fúze s oocytem. Při pozorování bylo vidět mezi kumulárními buňkami 11 spermií ze 48, které měli neporoušený akrozom (GFP⁺) a 37 spermií po akrozomální reakci (GFP⁻). Větší úspěch k dosažení ZP mají spermie, u kterých dojde k akrozomální reakci již mezi kumulárními buňkami. Z těchto spermií bylo na ZP navázáno 9, zatímco žádné bez nenarušeného akrozomálního váčku (Jin a kol., 2011).

Tato práce jasně ukázala, že ztrátu akrozomu při kontaktu spermie s kumulárními buňkami nelze považovat za patologický stav, ale že se jedná o fyziologický proces (Chen a kol., 2012). Zatím není zcela jistý význam tohoto postupu, ale je možné, že vrstvu kumulárních buněk je nutné rozrušit pomocí akrozomálního obsahu, stejně

jako při penetraci ZP. Některé spermie mohou prodělat akrozomální reakci dříve, aby narušil buněčnou masu kumulárních buněk a tím usnadnili přístup ostatním spermii k ZP. Tyto spermie by poté mohly vylít svůj akrozomální váček až po navázání na ZP (Sun a kol., 2011).

Tuto hypotézu vyvrací již dříve objevený protein PH-20 na plazmatické membráně spermie. Hlavní složkou extracelulární matrix kumulárních buněk je kyselina hyaluronová, kterou by protein rozrušil hyaluronidázovou aktivitou. Tím by nemuselo nutně dojít k AR ještě před dosažením ZP (Lin a kol., 1994). Nicméně u PH-20 deficientní myší linie dochází ke zpoždění při penetraci kumulární vrstvou, ale ne ke sterilitě. PH-20 a další enzymy (Hyal5) mohou usnadňovat průnik, ale nejsou dostačující (Baba a kol., 2002)

Akrozin

V akrozomálním váčku se nacházejí proteolytické enzymy umožňující rozrušení vaječných obalů. Za nejdůležitější je považován akrozin (Töpfer-Petersen a kol., 1987), nikoli u všech druhů. Pro výzkum byly použity krysy akrozin deficientní spermie ($Acr^{-/-}$). Deficientní spermie nevykazovaly žádný deficit ve spermatogenezi, velikosti, tvaru ani pohyblivosti (Isotani a kol., 2017).

Za podmínek in vivo, pro výzkum schopnosti fertilizace akrozin deficientních spermií, byly spáreny wild-type samice s wild-type a akrozin defecientními samci. U akrozin deficientních spermií dochází k výraznému poklesu velikosti vrhu. Dále byla získána vajíčka z wild-type samic po 48 hodinách po inseminaci. Většina vajíček inseminována wild-type spermiemi se vyvinula ve dvoubuněčné embryo, zatímco s akrozin deficientními spermiemi bylo oplozených vajíček velmi málo (Isotani a kol., 2017).

Akrozin deficientní spermie rozrušují kumulární vrstvu buněk velmi pomalu, a proto je uvolnění akrozinu z akrozomálního váčku již na kumulárních buňkách podstatné. Akrozin neovlivňuje vazbu spermie na zonu pellucidu, fúzi s vajíčkem, a dokonce ani penetrace skrz zonu pellucidu není výrazně zpomalená jeho nepřítomností. Významný rozdíl nastává při penetraci spermií k vajíčku obklopeného kumulárními buňkami. Pokles počtu spermií, které prošly přes kumulární buňky, byl přibližně o 60 % nižší u akrozin deficientních spermií, než u wild-type spermií (Isotani a kol., 2017).

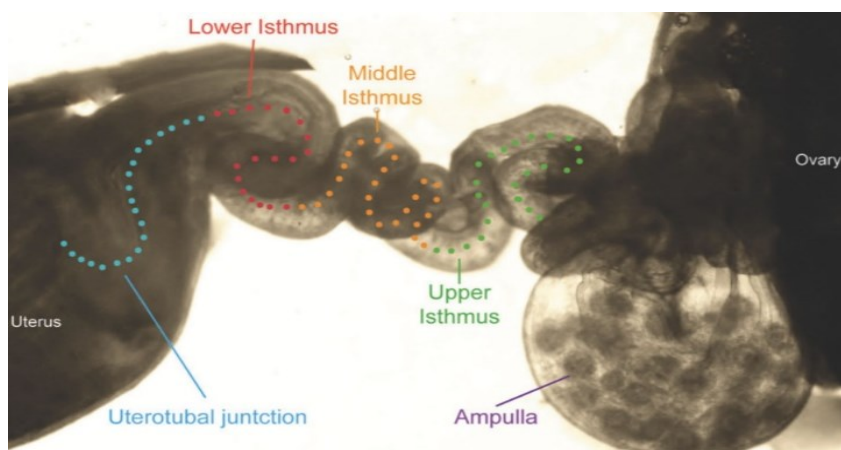
Signalizace spermií a kumulárních buněk

Když spermie dorazí ke kumulárním buňkám, dochází k uvolnění NYD-SP8 a k následnému navázání na kumulární buňky. Pokud byly spermie inkubovány s kumulárními buňkami, které jsou negativní na NYD-SP8, po dobu šesti hodin, pak po jejich odmytí byl tento protein pozorován na kumulárních buňkách. Po navázání NYD-SP8 u nich dochází ke zvýšení intracelulární koncentrace vápenatých iontů (Ca^{2+}) (Yin a kol., 2008).

Mobilizace vápenatých iontů vede k produkci a uvolnění progesteronu z kumulárních buněk. Ten je po té odpovědný za spuštění akrozomální reakce, uvolnění hydrolytických enzymů a usnadnění penetrace spermie přes kumulární buňky k zoně pellucidě. Produkce progesteronu je inhibována, pokud je k interagujícím gametám přidána protilátka proti NYD-SP8. Následně nedojde ani k akrozomální reakci. Po přidání progesteronu je možné tuto inhibici obejít a akrozomální reakci spustit (Yin a kol., 2008).

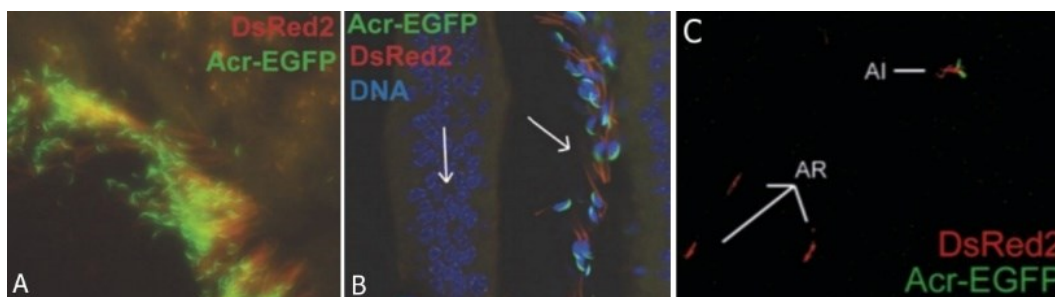
Průběh akrozomální reakce v samičím reprodukčním traktu *in vivo*

Aby bylo dosaženo přírodních podmínek při pozorování pohybu spermií v samičím reprodukčním traktu, byly použity fluorescenčně označené spermie. Pomocí invertovaného epifluorescenčního mikroskopu a kamery mohly být spermie živě pozorovány při migraci vejcovodem (La Spina a kol., 2016).



Obrázek 3 Označené části vejcovodu: uterus (děloha), utero-tubální spojení (modře), spodní istmus (červeně), střední istmus (žlutě), horní istmus (zeleně), ampula (fialově), ovary (vaječník), istmus – zúžený úsek vejcovodu, ampula – rozšířený úsek vejcovodu (La Spina a kol., 2016)

Po inseminaci bylo nejvíce spermií pozorováno v děloze a menší množství vstoupilo do utero-tubálního spojení, spodního istmu a středního istmu. Jen malý počet spermií se dostal až do horního istmu a do rozšířeného úseku zvaného ampula. Většina spermií, které prošly přes utero-tubální spojení do spodního istmu, kde vytvořily rezervoár, nebyly po akrozomální reakci (obr. 9 B). Dále se menší počet dostal do středního istmu, kde byla většina spermií opět akrozomálně intaktní. Velmi málo spermií se dostalo do horního istmu, kde bylo již několik spermií po AR (40 %) a v ampule bylo pozorováno jen 5 % akrozomálně intaktních spermií. Významný rozdíl v počtu intaktních a akrozomálně zreagovaných spermií tedy nastává při přechodu ze středního istmu do horního istmu, a ještě větší rozdíl je vidět mezi středním istmem a ampulou (La Spina a kol., 2016).



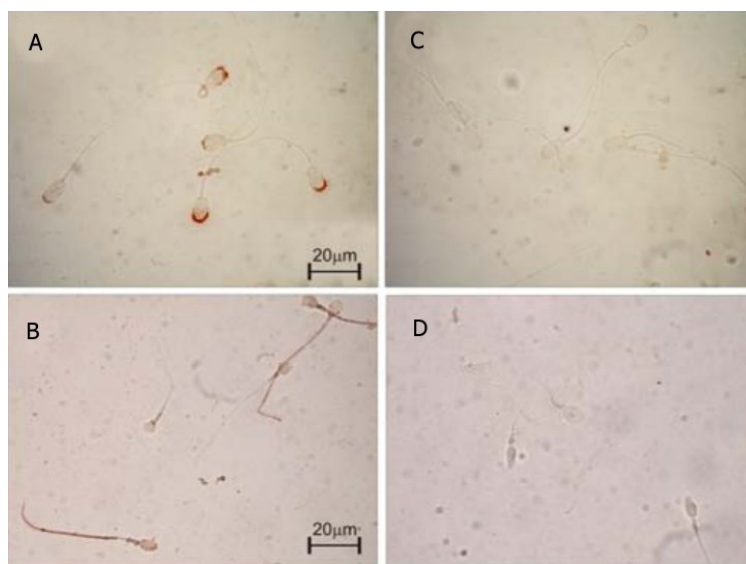
Obrázek 4 Fluorescenčně označené spermie: A) velký počet spermií v průřezu utero-tubálního spojení B) průřez spodního istmu, pravá šipka ukazuje spermie akrozomálně intaktní v záhybu vejcovodu a levá šipka ukazuje stěnu vejcovodu C) malý počet spermií v horním istmu, spermie bez akrozomu (AR) a spermie s akrozomem (AI) (La Spina a kol., 2016)

Spermie, které se nacházejí v blízkosti oocytů, mezi kumulárními buňkami, nebo dokonce ještě před objevením kumulárních buněk již podstoupily akrozomální reakci. Díky pozorování *in vivo* spermie musely projít celým reprodukčním systémem jak u samců, tak u samic a tím byly vystaveny všem fyziologickým podmínkám. Významný počet spermií podstoupil akrozomální reakci ještě před vstupem do ampuly, to znamená, že by akrozomální enzymy mohly sloužit ještě k jinému účelu než k penetraci oocytárních obalů. Vzhledem k větší vzdálenosti ampuly od místa, kde se nachází oocyt jsou možná nutné také další fyziologické spouštěče akrozomální reakce než jen předpokládaný progesteron (La Spina a kol., 2016).

Kumulární buňky a chemotaxe

Spermie v samičím reprodukčním traktu pomocí chemoatraktantů mohou najít komplex kumulárních buněk s vajíčkem. Hlavní chemoatraktivní látkou je progesteron, na který reagují za velmi nízké koncentrace (kolem 100 pM) (Guidobaldi a kol., 2017). Měřením koncentrace progesteronu ve třech odlišných médiích bylo zjištěno, že je produkován kumulárními buňkami, nikoli samotným vajíčkem. V mediu jen s vajíčkem nebyl naměřen žádný progesteron, zatímco vysoká hladina progesteronu byla naměřena v mediu s komplexem kumulárních buněk a vajíčka, a také v mediu se samotnými kumulárními buňkami. Přidáním progesteronových protilátek ke komplexu kumulárních buněk s vajíčkem dojde k významnému snížení chemotaxe spermií (Guidobaldi a kol., 2008).

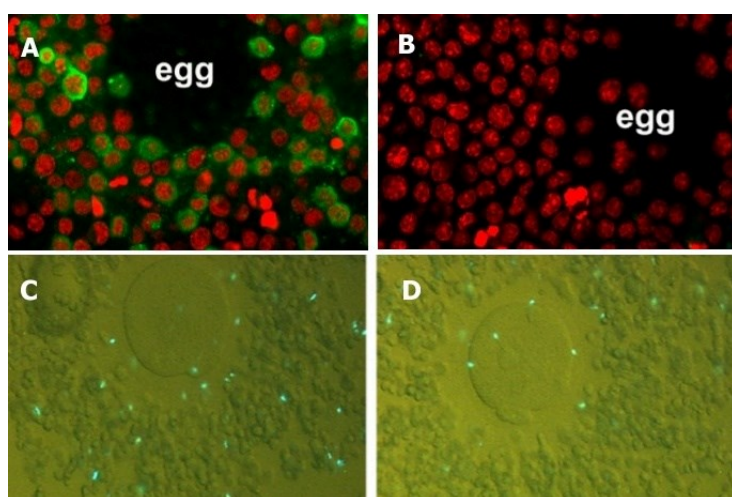
Na spermiích byly detekovány povrchové progesteronové receptory (Guidobaldi a kol., 2008), které jsou nejspíše nezbytné jak v chemotaxi, tak v signalizační dráze,



Obrázek 5 Progesteronové receptory označené protilátkou: A) receptory v akrozomální oblasti na králičích spermiích B) receptory v akrozomální oblasti a na bičíku lidských spermiích C, D) bez protilátek, nejsou vizualizované receptory, kontrolní snímky (Guidobaldi a kol., 2008)

která vede až k akrozomální reakci. Označením pomocí protilátky, která rozeznává receptorový protein, byly nalezeny oblasti výskytu. U králičích spermií se progesteronový receptor nachází v akrozomální oblasti, zatímco u lidských spermií byly také označeny bičíky. Inhibicí progesteronových receptorů je chemotaxe spermií téměř zastavena (Guidobaldi a kol., 2008). Orientace myších spermií s

porušeným akrozomem je nízká, jen spermie s intaktním akrozomem, místem plným progesteronových receptorů, vykazují silné chemotaktické chování. Poté, co dojde k akrozomální reakci, ztrácejí spermie své již nepotřebné receptory. Pomocí receptorů byly vedeny celým vejcovodem (Guidobaldi a kol., 2017), až do horního istmu, kde je vysoký počet spermií po akrozomální reakci (La Spina a kol., 2016). Progesteron je nejsilnější chemoatraktivní látkou, ale ne jedinou, protože komplexu kumulárních buněk s vajíčkem dosáhnou také spermie s porušeným akrozomem (Guidobaldi a kol., 2017). Spermie by mohly být tudíž také vedeny proteinem CRISP1, který je exprimován na spermiích, ale nyní byl nově objeven v samičím reprodukčním traktu. CRISP1 je vylučován kumulárními buňkami, ale ve vajíčku se nenachází. Menší počet spermií byl pozorován mezi CRISP1 deficientními kumulárními buňkami než mezi buňkami s přítomností proteinu. Jednou z možností bylo, že absence CRISP1 mění strukturu a organizaci matrix kumulárních buněk a tím je méně prostupná pro spermie. Vyvrátila to spontánní či hyaluronidázou vyvolaná disperze kumulárních buněk, která nevykazovala žádný rozdíl v závislosti na přítomnosti CRISP1. Redukovaný počet spermií v oblasti CRISP1 deficientních kumulárních buněk nastal, protože koncentrační gradient proteinu CRISP1 orientuje spermie v samičím reprodukčním traktu podobně jako progesteron. V přítomnosti CRISP1 dochází ke zvýšení lineárního pohybu spermií vedených k vajíčku (Ernesto a kol., 2015).



Obrázek 6 Protein CRISP1 v komplexu kumulárních buněk a vajíčka: A) imunofluorescenční značení CRISP1 použitím protilátky (zeleně) B) CRISP1 deficientní kumulární buňky C) spermie v komplexu kumulárních buněk s proteinem CRISP1 D) redukovaný počet spermií v komplexu CRISP1 deficientních kumulárních buněk, C, D) barvení spermií pomocí Hoechst (Ernesto a kol., 2015)

Dříve se za zdroj chemoatraktivních látek považovaly folikulární buňky, ale vajíčko je po ovulaci opouští. Znamenalo by to nedostatek chemoatraktivních látek po celou dobu přežívání vajíčka, a proto jsou kumulární buňky považovány za hlavní stálý zdroj. Za další chemoatraktivní látky jsou například považovány adrenalin, acetylcholin, atriální natriuretický peptid, heparin, bourgenal a lyral. (Sliwa, 2009), (Sliwa, 2009). Je jisté, že jsou produkovány v jiných buňkách a jsou odlišné v rámci živočišných druhů (Eisenbach a kol., 2006).

Mechanismus působení těchto látek na spermii není zcela objevený. Některé látky indukují zvýšení koncentrace intracelulárního vápníku a tím vyvolají například kapacitaci, hyperaktivaci, nebo akrozomální reakci (Meizel a kol., 1997). Na membráně bičíku (na hlavní části, tedy mezi krčkem a koncovou částí) se nacházejí vápenaté kanály CatSper, které zprostředkovávají vpuštění vápenatých iontů z extracelulárního prostředí do buňky. Tyto kanály jsou pro spermie specifické (Lishko a kol., 2011). Koncentrační růst intracelulárního vápníku má více směrů. Může jít anterográdním (od bičíku k hlavičce spermie) či retrográdním směrem (od hlavičky do bičíku spermie) (Romarowski a kol., 2016). Vrstva kumulárních buněk se dělí na vnější rozvolněnou vrstvu a na vrstvu vnitřní, velice kompaktní u vajíčka. Inseminací komplexu kumulárních buněk s vajíčkem lze vidět rozdíl mezi intaktními spermii a spermii inkubovanými s vápenatými ionty před inseminací. Většina intaktních spermií prošla skrz vnější rozvolněnou vrstvu, ale přes kompaktní se nedostala. Zatímco spermie ovlivněné vápenatými ionty prošly snadno skrz obě vrstvy kumulárních buněk (Hino a kol., 2016).

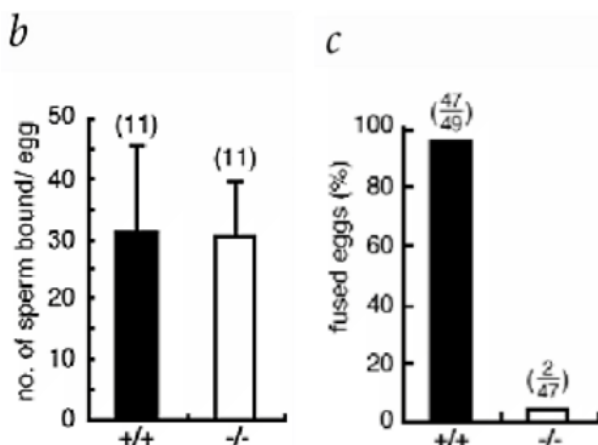
Dalšími receptory nacházejícími se na povrchu spermií jsou olfaktorické (ORs, čichové) receptory. Na akrozomu, krčku a ocásku se nacházejí OR4S1, OR4C13 a OR111, u kterých dosud není jistá funkce, ale mohlo by se jednat o další receptory pro chemoatraktivní látky (Milardi a kol., 2018), jako dříve objevený hOR17-4. Bourgenal je silným ligandem pro receptor hOR17-4. Tyto receptory jsou spřažené s G-proteiny, tudíž vyvolávají signalizaci pomocí druhých posílů (Spehr a kol., 2004).

Proteiny nezbytné pro fúzi spermie a oocytu

CD9

CD9 je protein patřící do tetraspaninové superrodiny (Kenji a kol., 2000). Na povrchu oocytu jsou mikrokilky, na kterých je exprimován (Kaji a kol., 2000). Jeho produkce není vázána pouze na oolemu (cytoplazmatická membrána oocytu), ale je aktivní i v mnoha buněčných typech a tkáních (Paul a kol., 1997). Tetraspaninové proteiny mají v buňkách plno funkcí. Interagují jak mezi sebou, tak s jinými proteiny, tím vytvářejí velké komplexy a podílejí se na regulaci pohyblivosti buněk, signalizaci a fúzi (Hemler, 2001). Jsou to transmembránové proteiny. Skládají se, ze čtyř hydrofobních segmentů (TM1-TM4), dvou extracelulárních smyček a krátké intracelulární domény mezi TM2 a TM3 a intracelulárním N a C koncem (Seigneuret a kol., 2001).

Pro výzkum funkce proteinu CD9 byli použity myši knock-out linie (Kenji a kol., 2000). Pomocí delece exonu 2 nedocházelo k expresi na povrchu buněk (Kaji a kol., 2000). Mutace byla provedena jak u samců, tak u samic. Samčí linie CD9^{-/-} nevykazovala žádné problémy ve zdraví, ani v růstu, ale CD9^{-/-} samice byly sterilní (Kenji a kol., 2000). Za stejných podmínek byly inseminovány wild-type a CD9 deficientní oocyty s wild-type spermii. Oocyty byly před inseminací zbaveny zony pellucidy. U obou typů oocytů došlo ke správnému navázání všech spermií k plazmatické membráně (Kaji a kol., 2000), ale u CD9 deficientních oocytů nedošlo k fúzi membrán a spermie se nahromadili v perivitellinním prostoru (Kenji a kol., 2000). U mutantních oocytů nedošlo k fúzi u 47 ze 49. U dvou zbývajících oocytů k fúzi došlo i přes chybějící protein CD9. U kontrolní skupiny byla situace přesně opačná (u 47 oocytů k fúzi došlo a u dvou nikoliv). (Kaji a kol., 2000).

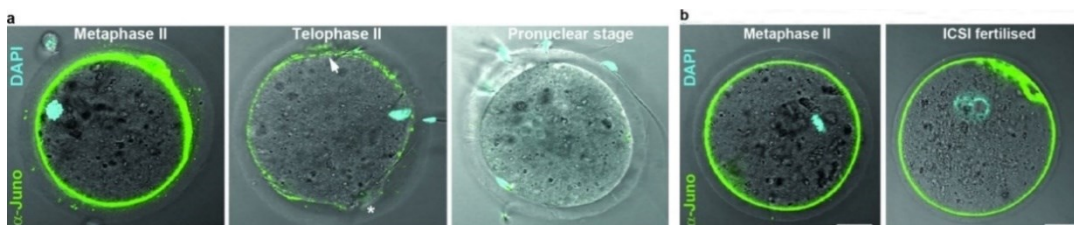


Graf 1 Porovnání wild-type a CD9^{-/-} oocytů: b) počet navázaných spermií na membránu, c) počet oocytů, u kterých došlo k fúzi membrán (Kaji a kol., 2000)

Juno

Juno je protein oocyty, který je kotven na oolemě pomocí GPI kotvy. Slouží jako receptor pro IZUMO1 lokalizovaný na membráně spermie. Juno je nezbytný pro fúzi membrán, což bylo experimentálně dokázáno pomocí blokovací protilátky, která oplození zabránila. Při oplození wild-type oocyty wild-type spermií vzniká normální zygota, ale při oplození oocyty ošetřeného anti Juno protilátkou wild-type spermií již k oplození nedochází (Bianchi a kol., 2014).

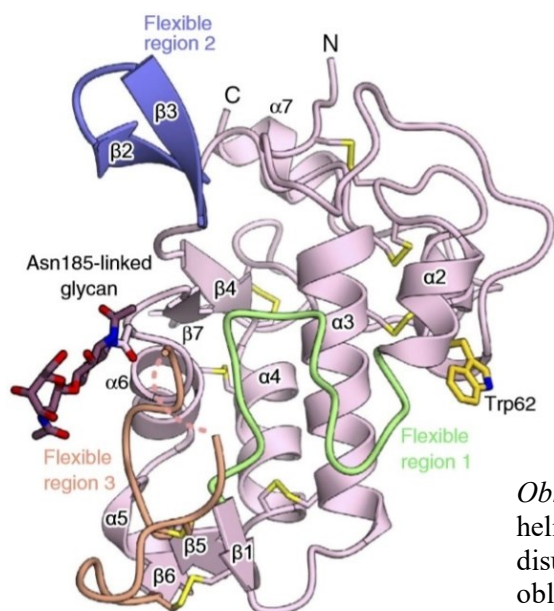
Je pravděpodobné, že se protein Juno také podílí na zabránění polyspermie. Po oplození oocyty se z jeho povrchu ztrácí, v telofázi II je proteinu na povrchu velmi málo a v pronukleární fázi není téměř žádný (Bianchi a kol., 2014). Po oplození dochází postupně ke změně struktury povrchu oolemy (Jackowski a kol., 1979). Nejspíše z mikrokloků vznikají extracelulární váčky, ve kterých se Juno nachází a tím opouští jeho povrch (Bianchi a kol., 2014). Metodou intracytoplazmatické injekce spermie (ICSI) nedojde k aktivaci bloku polyspermie (Gardner a kol., 2005), čili nedochází ani ke ztrátě Juno proteinu z povrchu (Bianchi a kol., 2014).



Obrázek 7 Přítomnost Juno proteinu na povrchu oocyty po oplození spermií a) Normálně oplozený oocyt, množství proteinu Juno se snižuje od metafáze II, přes telofázi II až po stádium tvorby prvojader, kdy již není detekovatelný, b) oocyt oplozený metodou ICSI, protein Juno je přítomný po celou dobu od metafáze II až do stádia tvorby prvojader (Bianchi a kol., 2014)

Juno má globulární tvar, skládá se ze sedmi α -helixů ($\alpha 1$ - $\alpha 7$), jednoho antiparalelního β -listu ($\beta 2$ a $\beta 3$), jednoho paralelního β -listu ($\beta 4$ a $\beta 7$) a jedné tří vláknové struktury ($\beta 1$, $\beta 5$ a $\beta 6$) (Kato a kol., 2016). Osm disulfidických vazeb stabilizuje α -helixy a flexibilní oblast (Aydin a kol., 2016).

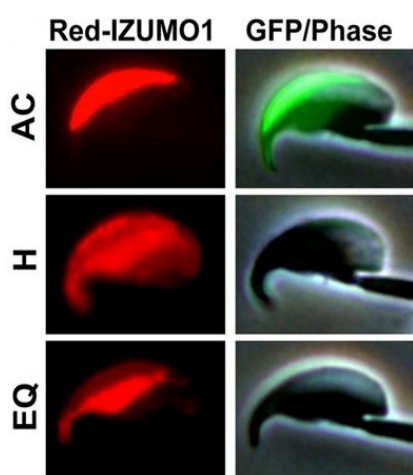
Struktura a sekvence proteinu Juno je velmi podobná lidskému folátovému receptoru (FR1 a FR2), který váže folát (vitamin B9) do centrální folátové kapsy (Chen a kol., 2013). Jen kvůli malé změně v konformaci a struktuře uvnitř proteinu Juno, není na rozdíl od FR1 a FR2 schopný folát vázat (Kato a kol., 2016).



Obrázek 8 Struktura proteinu Juno: alfa helixy ($\alpha 1$ - $\alpha 7$), beta listy ($\beta 1$ - $\beta 7$), disulfidické vazby (žlutě), tři flexibilní oblasti (zelená, oranžová a bodrá), (Kato a kol., 2016)

IZUMO1

Pomocí protilátky OBF13 proti myším spermím byla objevena sekvence proteinu Izumo1. Poté byl objeven také homologní lidský gen pro Izumo1. Jeho funkce se zjistila pomocí Izumo1 deficientní myši linie (Izumo1^{-/-}). Pomocí křížení wild-type myších samic a Izumo1^{-/-} myších samců se zjistilo, že dospělí samci jsou zdraví a nevykazují žádné abnormality, ale jsou sterilní. V *in vitro* podmínkách se přímým přenosem Izumo1^{-/-} spermií do cytoplasmatického prostoru wild-type oocyty potvrdilo, že Izumo1 protein má vliv na adhezi spermií-oocyt, nikoli na vývoj samotného embrya (Inoue a kol., 2005).

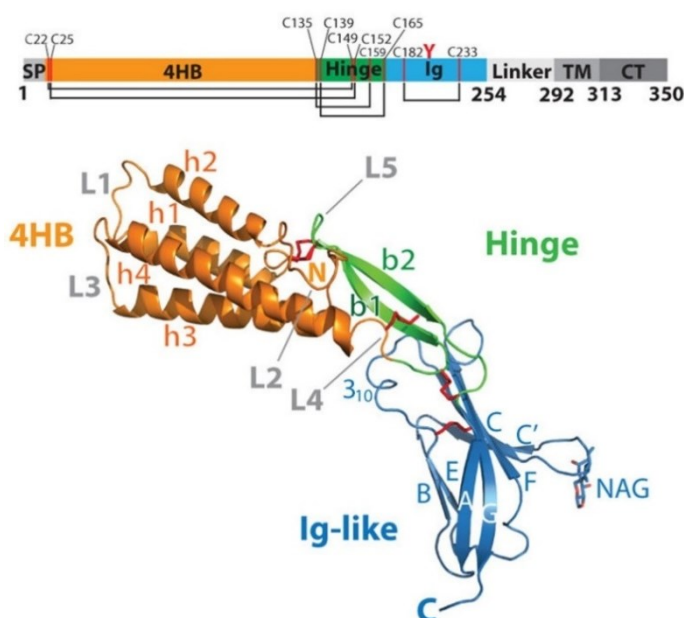


Izumo1 je na cytoplasmatické membráně odhalen až po akrozomální reakci (Inoue a kol., 2005), která je nezbytná pro oplození (Imai a kol., 1980). Pomocí fluorescenčního barvení byl pozorován přesun Izumo1 z akrozomálního váčku na plazmatickou membránu spermií. Izumo1 je umístěn na vnitřní i vnější akrozomální membráně. Během akrozomální reakce, kdy dochází k fúzi vnější akrozomální a plazmatické

Obrázek 9 Vizualizace distribuce Izumo1 pomocí fluorescence: Izumo1 (červeně-mCherry), obsah akrozomu (zeleně-GFP), AC-před akrozomální reakcí, Izumo1 je jen v oblasti akrozomální čepičky, H a EQ-rozšíření Izumo1 po celé hlavičce, hlavně v ekvatoriálním segmentu po akrozomální reakci (Satouh a kol., 2012)

membrány, vznikají póry, kterými je vypuštěn obsah akrozomálního váčku. Přitom dochází k přesunu Izumo1 na plazmatickou membránu, kde má tendenci se shromažďovat v ekvatoriálním segmentu (Satouh a kol., 2012). V tomto segmentu také dochází k nejintenzivnějšímu kontaktu s mikrokly na oocyty (Imai a kol., 1980). Již po pár minutách kontaktu obou gamet dochází k adhezi. Přímo v místě kontaktu se zvyšuje hustota obou proteinů, jak Izumo1, tak CD9 (Chalbi a kol., 2014).

Izumo1 se řadí do imunoglobulinové proteinové rodiny (Inoue a kol., 2005). Jedná se o stabilní monomerní protein, jeho tvar připomíná boomerang. Skládá se převážně z extracelulární domény, krátkého transmembránového úseku a krátkého intracelulárního ocásku. Extracelulární sekundární struktura obsahuje α -helixy a β -listy. Vytváří tak dvě hlavní domény, první se skládá ze čtyř helixů (4HB) s N-koncem a druhá představuje imunoglobulinovou doménu (Ig). Tyto domény jsou propojeny pomocí dvou antiparalelních β -listů (Aydin a kol., 2016). Celý protein obsahuje deset cysteinů, které mezi sebou vytvářejí pět disulfidických vazeb přispívající ke stabilizaci (Ohto a kol., 2016).



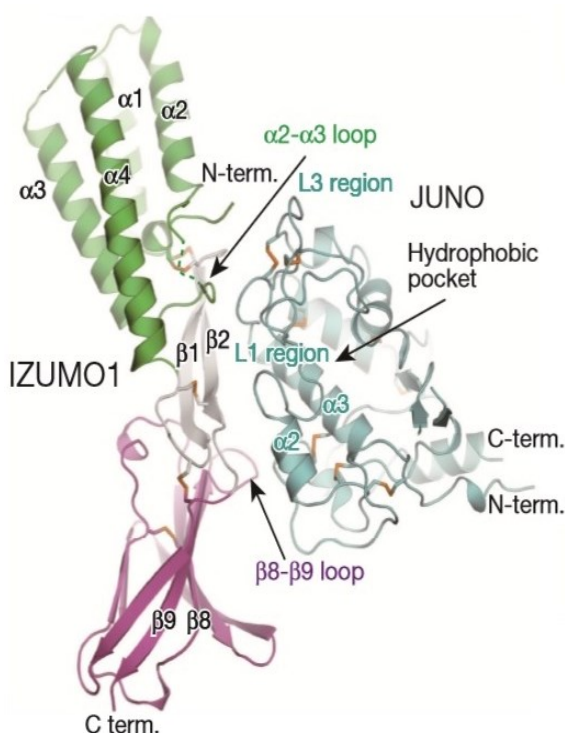
Obrázek 10 Struktura proteinu IZUMO1: 4HB doména ze čtyř helixů (h1-h4), L1 smyčka spojující h1 a h2, L3 smyčka spojující h3 a h4, L2 dlouhá smyčka spojující h2 a h3, Ig-like je imunoglobulinová doména, Hinge (b1+b2 antiparalelní beta listy), disulfidické vazby (červeně) (Aydin a kol., 2016)

Interakce IZUMO1 s proteinem Juno

Dle experimentu Inoue a kol. musí Izumo1 obsahovat primární aminokyselinovou sekvenci, která je zodpovědná za vazbu na oocyt. K určení přesné sekvence použili tři protilátky anti-Izumo1 (Mab34, Mab120 a Mab125). Fertilizaci inhibovaly jen Mab34 a Mab120. Sekvence celého proteinu obsahuje 377 aminokyselin. Nejdelší část patří do extracelulární domény, u které pracovali se třemi sekvencemi Asp5-Leu113, Glu146-Leu232 a Pro234-Arg298. Sekvence Glu146-Leu232 tvoří Ig doménu. Mab34 a Mab120 se navázaly jen do sekvence Asp5-Leu113, která se nachází na N-konci proteinu. Segment byl nazván funkčním fragmentem Izumo1 (Izumo_{PFF}), jeho sekundární struktura je helixový dimer. Poslední protilátka Mab125, která neinhibovala fertilizaci, se navázala na sekvenci Pro234-Arg298, která se nachází mezi Ig a transmembránovou doménou (Inoue a kol., 2013).

Také objevili, že Izumo1_{PFF} se může vázat na CD9 deficientní oocyt, tudíž mezi nimi nedochází k přímé interakci. Tímto předpokládali existenci jiného vazebného partnera, který byl později objeven jako Juno (Inoue a kol., 2013).

Izumo1 přítomný na spermii váže receptor Juno přítomný na oocyту (Aydin a kol., 2016) a vytvářejí mezi sebou stabilní IZUMO1-Juno komplex (Ohto a kol., 2016).



Po prvních pár minutách kontaktu obou gamet dojde ke vzniku silné vazby (Chalbi a kol., 2014). Proteiny spolu interagují v místech, kde je možné vazbu vytvořit. Na ní se nejvíce podílejí Van der Waalsovy síly, hydrofobní vazby (Ohto a kol., 2016), aromatické interakce a vodíkové můstky (Aydin a kol., 2016).

Každá molekula obsahuje oblasti, které se na vazbě podílejí nejvíce. Na Izumo1 se účastní všechny tři

Obrázek 11 Struktura komplexu IZUMO1-Juno: oblasti podílející se na vazbě ($\alpha 2$ - $\alpha 3$ smyčka, Hinge oblast $\beta 1$ a $\beta 2$, $\beta 8$ - $\beta 9$ smyčka na Izumo1 a L3 oblast, L1 oblast hydrofobní kapsy, $\alpha 1$, $\alpha 2$ a $\alpha 3$ helix na Junu (Ohto a kol., 2016)

hlavní části proteinu (Aydin a kol., 2016), 4HB doména (smyčka mezi $\alpha 2$ a $\alpha 3$ helixem), středová oblast Hinge ($\beta 1$ a $\beta 2$) a Ig doména (smyčka mezi $\beta 8$ a $\beta 9$). Na Junu interagují oblasti především $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ helix a N-konec proteinu (Ohto a kol., 2016).

Při vzniku tohoto komplexu nedochází k velkým změnám proteinové struktury (Ohto a kol., 2016). Ke konformační změně dochází jen u 4HB domény a oblasti Hinge, ale Ig doména a Juno zůstává beze změny. Posunem všech helixů 4HB domény, smyčky mezi $\alpha 2$ a $\alpha 3$ helixem a Hinge oblastí směrem k molekule Juno, se mění lehce zahnutý tvar molekuly Izumo1 na vzpřímenější (Aydin a kol., 2016).

Fertilin

Patří do velké rodiny proteinů ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease Domain), které se vyznačují přítomností disintegrinové a metaloproteázové domény. Některé proteiny z této rodiny jsou přítomny v mnoha tkáních (např.: fertilin α a ADAM4), ale fertilin β a cyritestin (ADAM3) jsou u myši exprimovány jen ve varlatech. ADAM proteiny mají plno funkcí, jsou ligandy především pro integriny, nebo jiné receptory, některé hrají roli ve fúzi membrán (Wolfsberg a kol., 1995).

Fertilin je transmembránový protein (Blobel a kol., 1990). Byl objeven u morčat pomocí protilátek mAb jako PH-30 protein na povrchu spermie. Byl identifikován jako nezbytný protein pro adhezi a fúzi spermie a oocyty, protože protilátky PH-30 mAb silně inhibovaly fúzi. Na spermiu je lokalizován v zadní části hlavičky. Pomocí analýzy SDS PAGE bylo zjištěno, že se skládá ze dvou podjednotek (Primakoff a kol., 1987). Podjednotky fertilin α a fertilin β spolu tvoří heterodimer (Cho a kol., 2000), který neobsahuje kovalentní vazby (Blobel a kol., 1990). Ve spermiích fertilin $\beta^{-/-}$ není detekován ani fertilin α , který se nejspíš postupně ztrácí během spermatogeneze (Cho a kol., 2000).

Obě podjednotky vznikají jako delší prekurzory v buňkách varlat, ale jejich úprava, proteolytické štěpení se odehrává nezávisle na sobě. Jen α řetězec je již hotový na spermiích ve varlatech (Blobel a kol., 1990). Zatímco fertilin β vzniká u morčat jako prekurzor o molekulové hmotnosti 101 kDa, ale až v kaudální části nadvarlat je rozdělen na menší části o 45 kDa (disintegrinová doména proteinu) a 55 kDa

(doména cytoplazmatického ocásku), které se vyskytují ve zralých spermiích. Fertilin β tedy vzniká a modifikuje se v nadvarlatech (Cho a kol., 2000).

Disintegrinová doména fertilinu β obsahuje DECD sekvenci, která umožňuje vazbu k integrinu. Váže se přímo na integrin $\alpha_6\beta_1$ na povrchu oocyty, tato vazba je vysoce specifická a zprostředkovává fúzi gamet (Chen a kol., 1999).

Závěr

Fúze membrán se účastní mnoho proteinů jak na spermii, tak na vajíčku, které umožňují vzájemnou vazbu a jejich splnutí. Stále jsou objevovány nové povrchové proteiny a jejich receptory, ale i přes to je známo jen velmi málo o molekulárním mechanismu zprostředkovávajícím tuto fúzi.

Ukázalo se, že kumulární buňky mají hodně funkcí. Zmiňovaný je zde především vylučovaný progesteron v roli chemoatraktivní látky a také uvolněný jako odpověď v komunikaci se spermii po navázání jejich proteinu NYD-SP8. Spermie na progesteron výrazně reagují, zachytávají ho pomocí receptorů a v častých případech to u nich vyvolává zvýšení intracelulárního vápníku. Bohužel přesné zachycení signálů a na to vyvolané reakce jsou doposud nevyjasněné.

Velký převrat nastává v akrozomální reakci, která nastává na kumulárních buňkách, aby přes ně uvolněné enzymy umožnili průchod spermii.

Pro další výzkumy vyvstává několik otázek týkajících se oplození. Zdali existují nějaké jiné spouštěče akrozomální reakce než progesteron, jestli má dřívější uvolnění akrozomálního obsahu další význam v samičím reprodukčním traktu a zdali dochází mezi spermii k vzájemné spolupráci. Další nezodpovězené otázky se týkají zvyšování intracelulárních vápenatých iontů, zdali je hlavní příjem z extracelulárního prostředí, nebo kde se ve spermii nachází jejich zásoba.

Seznam použité literatury

Sekundární citace označeny *

***Rowe a kol.** Postcopulatory sexual selection is associated with accelerated evolution of sperm morphology [Online]. - 2015. - <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/evo.12620>.

***Yanagimachi R.** Mammalian fertilization [Kniha]. - New York : Raven Press, 1994. - stránky 189–317.

Aydin a kol. H. Molecular architecture of the human sperm IZUMO1 and egg JUNO fertilization complex [Online] // Web of Science. - 23. Červen 2016. - https://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=1&SID=F6ZeryvSqTxLoCGOILa&page=1&doc=1.

Baba a kol. D. Mouse Sperm Lacking Cell Surface Hyaluronidase PH-20 Can Pass through the Layer of Cumulus Cells and Fertilize the Egg [Online] // The Journal of Biologocal Chemistry. - 10. Květen 2002. - <http://www.jbc.org/content/277/33/30310.full.pdf>.

Barón a kol. L. Participation of protein kinases and phosphatases in the progesterone-induced acrosome reaction and calcium influx in human spermatozoa [Online] // Andrology. - 1. Říjen 2016. - <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/andr.12234>.

Bianchi a kol. Enrica Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization [Online] // Web of Science. - 24. 04 2014. - https://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=1&SID=C3JOf6cYMqwcVd9VP5&page=1&doc=4.

Blobel a kol. C. Proteolytic processing of a protein involved in sperm-egg fusion correlates with acquisition of fertilization competence [Online] // Journal of Cell Biology. - 1. Červenec 1990. - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2116150/>.

Eisenbach a kol. M. Sperm guidance in mammals - An unpaved road to the egg [Online] // Nature Reviews Molecular Cell Biology. - Duben 2006. -

https://www.researchgate.net/publication/7173327_Sperm_guidance_in_mammals_-_An_unpaved_road_to_the_egg.

Ernesto a kol. J. CRISP1 as a novel CatSper regulator that modulates sperm motility and orientation during fertilization [Online] // Journal of Cell Biology. - 25. Zář 2015. - <http://jcb.rupress.org/content/210/7/1213>.

Gardner a kol. A. Mammalian membrane block to polyspermy: new insights into how mammalian eggs prevent fertilisation by multiple sperm [Online] // Reproduction, Fertility and Development. - 14. Prosinec 2005. - <http://www.publish.csiro.au/RD/RD05122>.

Guidobaldi a kol. H. An intact acrosome is required for the chemotactic response to progesterone in mouse spermatozoa [Online] // Molecular Reproduction and Development. - Duben 2017. - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5395337/>.

Guidobaldi a kol. H. Progesterone from the Cumulus Cells Is the Sperm Chemoattractant Secreted by the Rabbit Oocyte Cumulus Complex [Online] // Plos One. - 22. Srpen 2008. - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2515641/>.

Hemler M. Specific tetraspanin functions [Online] // Journal of Cell Biology. - 2001. - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2199333/>.

Hino a kol. T. The Behavior and Acrosomal Status of Mouse Spermatozoa In Vitro, and Within the Oviduct During Fertilization after Natural Mating [Online] // Biology of Reproduction. - 1. Zář 2016. - <https://academic.oup.com/biolreprod/article/95/3/50,%201-11/2883444>.

Hirohashi N. Site of Mammalian Sperm Acrosome Reaction [Oddíl knihy] // Sperm Acrosome Biogenesis and Function During Fertilization. - [místo neznámé] : Springer, 2016.

Chalbi a kol. M. Binding of sperm protein Izumo1 and its egg receptor Juno drives Cd9 accumulation in the intercellular contact area prior to fusion during mammalian fertilization [Online] // The Company of Biologists. - 1. Srpen 2014. - <http://dev.biologists.org/content/141/19/3732>.

Chen a kol. H. Ca²⁺ mobilization in cumulus cells: Role in oocyte maturation and acrosome reaction [Online] // Cell Calcium. - 4. Prosinec 2012. - <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0143416012001856?via%3Dihub>.

Chen a kol. H. Mediation of sperm-egg fusion: evidence that mouse egg $\alpha 6 \beta 1$ integrin is the receptor for sperm fertilin β [Online] // Chemistry & Biology. - Leden 1999. - [https://www.cell.com/cell-chemical-biology/pdf/S1074-5521\(99\)80015-5.pdf](https://www.cell.com/cell-chemical-biology/pdf/S1074-5521(99)80015-5.pdf).

Chen a kol. Ch. Structural basis for molecular recognition of folic acid by folate receptors [Online] // Nature. - 22. Srpen 2013. - <https://www.nature.com/articles/nature12327>.

Cho a kol. Ch. Analysis of Mouse Fertilin in Wild-Type and Fertilin $\beta^{-/-}$ Sperm: Evidence for C-terminal Modification, α/β Dimerization, and Lack of Essential Role of Fertilin α in Sperm–Egg Fusion [Online] // Developmental Biology. - 15. Červen 2000. - <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160600997033?via%3Dihub>.

Imai a kol. H. Ultrastructural Observations of Boar Spermatozoa Penetrating Zona-Free Hamster Eggs [Online] // Biology of Reproduction. - 1. Srpen 1980. - <https://academic.oup.com/biolreprod/article/23/2/481/2766887>.

Inoue a kol. N. Molecular dissection of IZUMO1, a sperm protein essential for sperm-egg fusion [Online] // Web of Science. - 1. Srpen 2013. - https://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=WOS&search_mode=GeneralSearch&qid=11&SID=F6ZeryvSqTxLoCGOILa&page=1&doc=4.

Inoue a kol. N. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs [Online] // Nature. - 10. Březen 2005. - <http://www.nature.com.ezproxy.is.cuni.cz/articles/nature03362>.

Isotani a kol. A. A delayed sperm penetration of cumulus layers by disruption of acrosin gene in rats [Online] // Biology of Reproduction. - 30. Červen 2017. - <https://academic.oup.com/biolreprod/article/97/1/61/3903016>.

Jackowski a kol. S. Surface Alterations of the Mouse Zona Pellucida and Ovum following in vivo Fertilization: Correlation with the Cell Cycle [Online] // Biology of Reproduction. - 1. Březen 1979. - <https://academic.oup.com/biolreprod/article/20/2/150/2767669>.

Jin a kol. Mayuko Most fertilizing mouse spermatozoa begin their acrosome reaction before contact with the zona pellucida during in vitro fertilization [Online] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. - 22. Březen 2011. - <https://www.pnas.org/content/108/12/4892.long>.

Kaji a kol. K. The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice [Online] // Nature Genetics. - 2000. - <https://www.nature.com/genetics//index.html>.

Kato a kol. K. Structural and functional insights into IZUMO1 [Online] // NATURE COMMUNICATIONS. - 15. Červenec 2016. - www.nature.com/naturecommunications.

Kenji a kol. M. Requirement of CD9 on the Egg Plasma Membrane for Fertilization [Online] // Web of Science. - 2000. - <https://eds-a-ebshost-com.ezproxy.is.cuni.cz/eds/pdfviewer/pdfviewer?vid=1&sid=ab77ef36-287e-4f06-bfd0-45f01c8e79a7%40sdc-v-sessmgr06>.

Klinovska a kol. Sperm-Egg Fusion: A Molecular Enigma of Mammalian Reproduction [Online]. - 2014. - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4100174/>.

Kurita a kol. A. Identification, Cloning, and Initial Characterization of a Novel Mouse Testicular Germ Cell-Specific Antigen [Online] // Biology of Reproduction. - 17. Květen 2000. - <https://academic.oup.com/biolreprod/article/64/3/935/2723486>.

La Spina a kol. F. Mouse sperm begin to undergo acrosomal exocytosis in the upper isthmus of the oviduct [Online] // Development Biology. - 15. Březen 2016. - <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160616300021?via%3Dihub>.

Lin a kol. Y. A Hyaluronidase Activity of the Sperm Plasma Membrane Protein PH-20 Enables Sperm to Penetrate the Cumulus Cell Layer Surrounding the Egg

[Online] // Journal of Cell Biology. - 1. Červen 1994. - <http://jcb.rupress.org/content/125/5/1157>.

Lishko a kol. P. Progesterone activates the principal Ca^{2+} channel of human sperm [Online] // Nature. - 17. Březen 2011. - https://www.researchgate.net/publication/50409870_Progesterone_activates_the_principal_Ca2_channel_of_human_sperm.

Meizel a kol. S. Progesterone Triggers a Wave of Increased Free Calcium during the Human Sperm Acrosome Reaction [Online] // Developmental Biology. - 1. Únor 1997. - <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160697984773?via%3Dihub>.

Meyers a kol. S. A Plasma Membrane-Associated Hyaluronidase Is Localized to the Posterior Acrosomal Region of Stallion Sperm and Is Associated with Spermatozoal Function [Online] // Biology of Reproduction. - 30. Březen 1999. - <https://academic.oup.com/biolreprod/article/61/2/444/2734560>.

Milardi a kol. D. Olfactory Receptors in Semen and in the Male Tract: From Proteome to Proteins [Online] // Frontiers in Endocrinology. - 23. Leden 2018. - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5787142/>.

Ohto a kol. U. Structure of IZUMO1–JUNO reveals sperm–oocyte recognition during mammalian fertilization [Online] // Nature. - 15. Červen 2016. - <http://www.nature.com.ezproxy.is.cuni.cz/articles/nature18596>.

Okabe Masaru The cell biology of mammalian fertilization [Online] // PubMed. - 11 2013. - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24194470>.

Oren-Benaroya a kol. R. The sperm chemoattractant secreted from human cumulus cells is progesterone [Online] // Human Reproduction. - 11. Červenec 2008. - <https://academic.oup.com/humrep/article/23/10/2339/713861>.

Paul a kol. S. Localization of the Transmembrane 4 Superfamily (TM4SF) Member PETA-3 (CD151) in Normal Human Tissues: Comparison with CD9, CD63, and $\alpha\beta 1$ Integrin [Online] // Journal of Histochemistry & Cytochemistry. - 1997. - <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/002215549704500404>.

Primakoff a kol. P. Identification and purification of a sperm surface protein with a potential role in sperm-egg membrane fusion [Online] // Journal of Cell Biology. - 1. Leden 1987. - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2117034/>.

Roldan a kol. E. Exocytosis in spermatozoa in response to progesterone and zone pellucid [Online] // Science. - 2. Prosinec 1994. - https://www.researchgate.net/publication/15214272_Exocytosis_in_spermatozoa_in_response_to_progesterone_and_zone_pellucid.

Romarowski a kol. A. A Specific Transitory Increase in Intracellular Calcium Induced by Progesterone Promotes Acrosomal Exocytosis in Mouse Sperm [Online] // Biology of Reproduction. - 27. Leden 2016. - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4829090/>.

Rowe, 2015; cit. dle Southern a kol. Helen Sperm morphology and the evolution of intracellular sperm-egg interactions [Online]. - 2018. - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5980432/#ece34027-bib-0043>.

Satouh a kol. Y. Visualization of the moment of mouse sperm-egg fusion and dynamic localization of IZUMO1 [Online] // Journal of Cell Science. - 19. Červenec 2012. - <http://jcs.biologists.org/content/125/21/4985>.

Seigneuret a kol. M. Structure of the tetraspanin main extracellular domain: a partially conserved fold with a structurally variable domain insertion [Online] // Journal of Biological Chemistry. - 2001. - <https://pdfs.semanticscholar.org/974e/2ab3f122c00191af86b44eea540bab124094.pdf>.

Sliwa A. Heparin as a Chemoattractant for Mouse [Online] // Journal of Reproductive Systems. - 9. Červenec 2009. - <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/01485019308988393>.

Sliwa A. Chemotactic effect of hormones in mouse [Online] // Journal of Reproductive Systems. - 9. Červenec 2009. - <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/01485019408987772>.

Spehr a kol. M. Particulate Adenylate Cyclase Plays a Key Role in Human Sperm Olfactory Receptor-mediated Chemotaxis [Online] // Journal of Biological Chemistry. - 8. Duben 2004. - <http://www.jbc.org/content/279/38/40194.long>.

Sun a kol. T. Acrosome reaction in the cumulus oophorus revisited: involvement of a novel sperm-released factor NYD-SP8 [Online] // Protein & Cell. - 31. Leden 2011. - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4875259/>.

Theodore Clark HAP2/GCS1: Mounting evidence of our true biological EVE? [Online]. - 2018. - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6117098/>.

Töpfer-Petersen a kol. E. Acrosin shows zona and fucose binding, novel properties for a serine proteinase [Oddíl knihy] // FEBS Letters / autor knihy Williams R. J. P.. - [místo neznámé] : Elsevier Science Publishers, 1987. - Sv. I.

Wolfsberg a kol. T. ADAM, a Widely Distributed and Developmentally Regulated Gene Family Encoding Membrane Proteins with ADisintegrin And Metalloprotease Domain [Online] // Developmental Biology. - Květen 1995. - <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012160685711529?via%3Dihub>.

Wolfsberg a kol. T. The precursor region of a protein active in sperm-egg fusion contains a metalloprotease and a disintegrin domain: Structural, functional, and evolutionary implications [Online] // Developmental Biology. - 15. Listopad 1993. - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC47862/>.

Yanagimachi, 1994; cit. dle Sun a kol. T. Acrosome reaction in the cumulus oophorus revisited: involvement of a novel sperm-released factor NYD-SP8 [Online] // Protein & Cell. - 31. Leden 2011. - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4875259/>.

Yin a kol. L. A sperm GPI-anchored protein elicits sperm-cumulus cross-talk leading to the acrosome reaction [Online] // Cellular and Molecular Life Sciences. - 11. Srpen 2008. - <http://eds.b.ebscohost.com/eds/detail/detail?vid=0&sid=210391bf-d513-49b6-a71b-73a1121d9f52%40pdc-v-sessmgr05&bdata=Jmxhbm9Y3Mmc2l0ZT1lZHMtbGl2ZSZzY29wZT1zaXRl#db=mdc&AN=19153666>.